



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Gebrauchsmuster**
⑩ **DE 298 20 466 U 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
C 07 K 14/435
C 07 K 14/79
A 61 K 38/17

②① Aktenzeichen:	298 20 466.5
②② Anmeldetag:	16. 11. 98
④⑦ Eintragungstag:	8. 4. 99
④③ Bekanntmachung im Patentblatt:	20. 5. 99

DE 298 20 466 U 1

⑦③ Inhaber:
Reutter, Werner, Prof. Dr.med., 14195 Berlin, DE

⑦④ Vertreter:
Hartmann, G., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
81679 München

⑤④ Rekombinante Glycoproteine und sie enthaltende Arzneimittel

DE 298 20 466 U 1

BEST AVAILABLE COPY

MÜNCHEN
Pienzenauer-Str. 2
D-81679 München
Tel.: +49- 89 9829 0272
Fax: +49- 89 9829 0273
[+49- 89 989 358]

RUSCHKE · HARTMANN · BECKER
MÜNCHEN - BERLIN
Anwaltssozietät

Patentanwälte
European Patent Attorneys
Dr. Ing. Hans Ruschke 1932-1980
Dipl.-Ing. Hans E. Ruschke
Dipl.-Chem. Dr. G. Hartmann

PA DR. G. HARTMANN Pienzenauerstr. 2 D-81679 München

5

Rechtsanwälte
Horst Ch. Becker, DEA
Anja Roxin *

Consultant
European Patent Attorney
British Chartered Patent Agent
Paul Madgwick B.Sc.

10 298 20 466.5
H 1278a-Gbm

Büro/Office Berlin*
Kurfürstendamm 125 A
D-10711 Berlin

25.02.99

15

Rekombinante Glycoproteine und sie enthaltende
Arzneimittel

20

Die Erfindung betrifft neue rekombinante Glycoproteine,
die als Botenstoffe, Signalstoffe, Promotoren, Stimulato-
ren und Initiatoren in vielfältiger Weise in den tieri-
schen, insbesondere menschlichen Kreislauf eingreifen; so-
25 wie sie enthaltende pharmazeutische Mittel. Die Erfindung
betrifft insbesondere neue rekombinante humane Glycopro-
teine (rh Glycoproteine), vorzugsweise neue rh Differen-
zierungsfaktoren, insbesondere rh Erythropoietin; neue rh
Wachstumsfaktoren, insbesondere rh CSF (Colony-Stimula-
30 ting-Factor), rh GMCSF (Granulocyten-Monocyten-Stimu-
lationsfaktor); neue rh Thrombolytika, insbesondere rh tPA
(Tissue-Plasminogen-Activator) und rh Urokinase; neue rh
Thromboprophylaktika, insbesondere rh Antithrombin III;
neue rh Gerinnungsfaktoren, insbesondere rh den Faktor
35 VIII und rh Faktor IX; neue rh Interferone, insbesondere

rh α -, β - und γ -Interferone; und neue rh Interleukine, insbesondere rh IL-2, IL-15, IL-16 und IL-17; Verfahren zu ihrer Herstellung; sie enthaltende pharmazeutische Mittel und ihre Verwendungen.

5

Als Glycoproteine werden Proteine bezeichnet, die kovalent gebundene Kohlenhydrate (Zucker) enthalten. Glycoproteine, insbesondere Human-Glycoproteine, wirken als Botenstoffe, Signalstoffe, Promotoren, Initiatoren oder Stimulatoren
10 von Stoffwechselprozessen bei Tieren und Menschen, die direkt oder indirekt in diese Stoffwechselprozesse eingreifen. Sie werden üblicherweise im Körper in vivo oder biosynthetisch gebildet und, nachdem sie ihre spezifische Funktion erfüllt haben, von diesem wieder ausgeschieden
15 oder abgebaut. Die im Körper in natürlicher Weise gebildeten Glycoproteine (sogenannte "native Glycoproteine") sind dadurch charakterisiert, daß sie an der Aminogruppe des Aminoglycan-Restes durch eine Acetylgruppe substituiert sind. Diese nativen Glycoproteine, die auf natürlichem Wege
20 in vivo oder auf biosynthetischem Wege hergestellt werden können (vgl. DE-PS 4 311 580), stellen bei Mensch und Tier wirksame Mittel dar zur Stimulierung des Wachstums und der Differenzierung von menschlichen und tierischen Zellen des Immunsystems und zur Verhinderung der Adhäsion
25 von Leukozyten, Thrombozyten und Tumorzellen an Gefäßendothelzellen; zur Stimulierung des Immunsystems, insbesondere von T-Lymphozyten, zur Infektabwehr, zur Behandlung von Immunschwächen, Tumorerkrankungen einschließlich Metastasierungsprozessen, Infektionserkrankungen und Kreislaufversagen, insbesondere Gefäßverschlüssen und Septikämien; zur Hemmung der Bindung eines Liganden an seinen sialylierten Zelloberflächen-Rezeptor; zur Hemmung der Bindung eines mikrobiellen Phagen oder Toxins an die Wirtszelle über einen sialylierten Rezeptor durch in vivo-
30 Modulation von Neuraminsäuren; zur biosynthetischen Herstellung von Liganden oder Rezeptoren mit modifizierter Neuraminsäure und Verwendung derselben zur Konkurrenz

physiologischer oder pathologischer Ligand-Rezeptor-Interaktionen; zur in vitro-Beeinflussung des Infektionsverlaufs mit humanen Immundefizienz-Viren sowie zur in vivo-Prävention der Infektion mit humanen Immundefizienz-
5 Viren; und zur Behandlung von parasitären Erkrankungen.

In tierischen Organismen kommen Glycoproteine als wesentliche Bestandteile von Zellmembranen sowie als lösliche Komponenten von Körperflüssigkeiten und der extrazellulären Matrix vor. Die Kohlenhydrate sind zu Ketten verknüpft
10 (Oligosaccharide) und können auf unterschiedliche Weise mit dem Proteingerüst verknüpft sein. Sie enthalten als wichtige Bestandteile der Zellmembran Sialinsäure (Derivate der 2-Keto-3-desoxy-D-glycero-D-galacto-nonulopyranosidonsäure (KDN)), der eine bedeutende Rolle bei biologischen Prozessen zukommt.
15

Je nach ihrem Bindungstyp werden die Oligosaccharide unterschiedlichen Gruppen zugeordnet. Die Oligosaccharide
20 von Säurethioglycoproteinen sind am häufigsten N-glycosidisch an einen Asparaginrest der Polypeptidkette gebunden (N-Glycane). In dieser Gruppe finden sich einerseits sezernierte Glycoproteine mit unterschiedlichen Funktionen, z.B. lösliche Enzyme, Immunglobuline und Hormone, andererseits
25 Membranglycoproteine, z.B. Membranenzyme, Transportproteine sowie Rezeptorproteine. Eine weitere Gruppe bilden die O-glycosidisch über einen Galatose-, N-Acetylgalactosamin- oder Xyloserest an einen Serin- oder Threoninrest der Polypeptidkette gebundenen Oligosaccharide (O-
30 Glycane). Zusammen mit N-Glycanen kommen sie auch in Immunglobulinen und anderen Glycoproteinen vor. Zu den O-Glycanen gehören auch die Oligosaccharide der Proteoglycane, die sich durch einen besonders hohen Kohlenhydratanteil auszeichnen. In diesen in der extrazellulären Matrix
35 vorkommenden Glycokonjugaten können die Oligosaccharide über einen Galactose-, N-Acetylgalactosamin- oder Xyloserest an das Polypeptidgerüst gebunden sein.

Die Glycoproteine, bestehend aus Monosacchariden und Eiweiß, werden häufig mit den Glycolipiden als Glycokonjugate zusammengefaßt. Die Zucker-Komponenten der Glycoproteine, die mit wenigen Ausnahme weniger als 50 % des Gesamt-Glycoproteins ausmachen, sind über durch Glycosidasen spaltbare O- oder N-glycosidische Bindungen mit dem Peptidanteil verknüpft. Als Kohlenhydrate finden sich in den Glycoproteinen Hexosen (Galactose, Mannose, seltener Glucose), N-Acetylhexosamine, N-Acetylneuraminsäure, Fucose und andere. Zur Identifizierung und Bestimmung der Glycoproteine eignet sich in erster Linie die Affinitätschromatographie mit pflanzlichen Lectinen als Liganden (z.B. Concanavalin A oder Weizenkeimagglutinin oder andere).

Zu den Glycoproteinen gehören fast alle Membran-Glycoproteine, Serumproteine, Plasmaproteine, die Blutgruppensubstanzen, viele Enzyme und Proteohormone, alle Antikörper, die Chalone, Muzine, Lectine, Bindine, Fibronectin, der Intrinsic-Faktor und dgl. Als Membran- oder Oberflächen-Proteine spielen manche Glycoproteine für die Pathogenität von Viren eine Rolle. Hier wie bei anderen Rezeptorspezifischen zellulären Wechselwirkungen sind die Kohlenhydrat-Komponenten für Erkennungsprozesse auf molekularer Ebene verantwortlich. Über bestimmte Zuckerstrukturen auf Rezeptoren heften einige Bakterien und Viren an ihre Zielzellen an.

Besonders bedeutungsvoll sind Oligosaccharid-Strukturen auch im Hinblick auf die Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktion. So vermitteln die Oligosaccharide von Glycoproteinen die Adhäsion von Neuralzellen und die Bindung von Lymphozyten an spezifische Endothelzellen. Außerdem können Oligosaccharide als antigene Determinanten von Glycoproteinen dienen. Auch während der Embryogenese und der Organogenese sind Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen

gen wesentlich an der spezifischen Zellerkennung beteiligt. Die maligne Transformation von Zellen ist von charakteristischen Veränderungen der Oligosaccharid-Strukturen von Glycoproteinen begleitet. Inwieweit veränderte
5 Oligosaccharid-Strukturen von Tumorzellen und Zell-Glycoproteinen dabei Ursache oder Wirkung der Tumorentstehung und Metastasierung sind, ist bis jetzt nicht eindeutig geklärt.

- 10 In Krankheitsfällen, in denen das Immunsystem beteiligt ist, ist die Unterstützung des Immunsystems durch Verabreichung von Substanzen, die Zellen des Immunsystems stimulieren, erforderlich. Die Suche nach Wirkstoffen zur
15 Stimulierung des Immunsystems ist daher ein bevorzugtes Ziel pharmakologischer Forschung. Wirkungsvolle Immunstimulantien mit wenig oder keinen Nebenwirkungen sind aber bisher nicht bekannt.

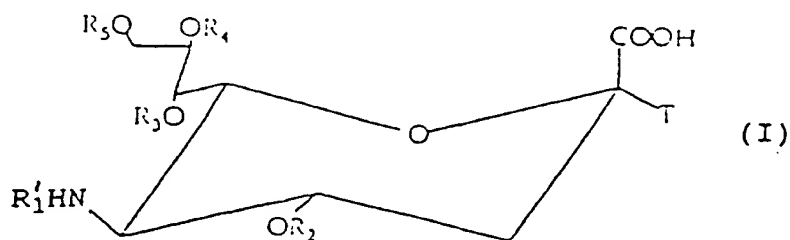
Aufgabe der Erfindung war es daher, neue Substanzen zu
20 finden, mit deren Hilfe es möglich ist, die von Glycoproteinen als Botenstoffe, Signalstoffe, Promotoren, Stimulatoren und Initiatoren gesteuerten Stoffwechselprozesse noch wirksamer, spezifischer und selektiver als bisher zu beeinflussen. Aufgabe der Erfindung war es insbesondere
25 solche neuen Glycoproteinen als Botenstoffe, Signalstoffe, Stimulatoren, Promotoren und Initiatoren für den menschlichen und tierischen Stoffwechsel zu finden, die in geringerer Dosis eingesetzt werden können und daher weniger unerwünschte Nebenwirkungen haben als die entsprechenden nativen Stoffe.
30

Es wurde nun gefunden, daß diese Aufgabe erfindungsgemäß dadurch gelöst werden kann, daß bei den obengenannten nativen Glycoproteinen die natürlicherweise vorhandene Acetylsubstitution in dem Aminoglycan-Rest durch eine andere
35 Acylgruppe, insbesondere durch eine (C₃-C₇)-Acylgruppe, oder einen Hydrocarbylrest, insbesondere einen (C₃-C₇)-

Alkyl-, -Alkenyl- oder -Alkinylnrest, ersetzt ist. Es hat sich nämlich gezeigt, daß die dabei erhaltenen neuen Verbindungen eine veränderte, insbesondere verlängerte, Pharmakokinetik, verglichen mit der biologischen Halblebenszeit (Halbwertszeit) der entsprechenden bekannten und handelsüblichen nativen Glycoproteine mit einer N-Acetylgruppe im Aminoglycanrest, aufweisen. Diese neuen Glycoproteine lassen sich auf die weiter unten beschriebene Weise insbesondere auf gentechnischem Wege herstellen, wobei man rekombinante Glycoproteine, insbesondere rekombinante Human-Glycoproteine (rh Glycoproteine), erhält.

Aufgrund ihrer veränderten, insbesondere verlängerten, Pharmakokinetik können diese Substanzen in wesentlich geringeren Dosen therapeutisch eingesetzt werden, wodurch auch die bisher bei Verwendung der entsprechenden nativen Substanzen festzustellenden unerwünschten Nebenwirkungen beträchtlich herabgesetzt werden können. Dies gilt insbesondere dann, wenn die neuen Glycoproteine in Form ihrer Derivate eingesetzt werden, in denen die OH-Gruppen des Monosaccharid-Anteils einfach oder mehrfach acyliert, vorzugsweise acetyliert, ist (sind).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind gemäß einem ersten Aspekt neue rekombinante Glycoproteine, insbesondere rekombinane Human-Glycoproteine (rh Glycoproteine) der allgemeinen Formel (I)



worin bedeuten:

- 5 R'_1 einen linearen oder cyclischen, unverzweigten oder verzweigten, gegebenenfalls ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten (C_3-C_7) -Acylrest, insbesondere (C_3-C_7) -Alkanoylrest, oder einen linearen oder cyclischen, unverzweigten oder verzweigten, gegebenenfalls ein- oder mehrfach hydroxylierten
- 10 und/oder ketylierten (C_3-C_7) -Hydrocarbylrest, insbesondere (C_3-C_7) -Alkyl-, -Alkenyl- oder -Alkinylrest,
- 15 R_2 , R_3 , R_4 und R_5 , die gleich oder verschieden sein können, jeweils Wasserstoff, einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen (C_nH_{2n+2} , $n = 1$ bis 20); einen linearen oder verzweigten Alkenylrest mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen (C_nH_{2n} , $n = 3$ bis 20, Position der Doppelbindung an C_n $n = 2$ bis 19); einen linearen oder verzweigten Al-
- 20 kinylrest mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen (C_nH_{2n-2} , $n = 3$ bis 20, Position der Dreifachbindung an C_n $n = 2$ bis 19); einen Alkenyl- bzw. Alkinylrest mit 2 oder mehr Doppelbindungen bzw. Dreifachbindungen mit 4 bis 20 Kohlenstoffatomen; einen Arylrest mit 6 bis 20
- 25 Kohlenstoffatomen; einen linearen oder verzweigten, gesättigten oder ein- oder mehrfach ungesättigten Acylrest $(-CO-R_1)$ mit insgesamt 1 bis 20 Kohlenstoffatomen einschließlich seiner ein- oder mehrfach hydroxylierten Analoga; einen Aroylrest mit 6 bis 20
- 30 Kohlenstoffatomen; einen Carbonylamidrest der Formel $-CONH_2$ oder $-CONHR_1$; einen linearen oder verzweigten, gesättigten oder ein- oder mehrfach ungesättigten Thioacylrest $(-CS-R_1)$ mit insgesamt 1 bis 20 Kohlenstoffatomen; oder einen Thiocarbamidrest der Formel
- 35 $CS-NH_2$ oder $-CS-NHR_1$; wobei R_1 jeweils für Wasserstoff oder einen linearen oder verzweigten, gesättigten oder ein- oder mehrfach ungesättigten Alkylrest

mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und jeder der
vorgenannten Reste außer H gegebenenfalls ein- oder
mehrfach substituiert sein kann durch Halogen-,
Hydroxy-, Epoxy-, Amino-, Mercaptan-, Phenyl-, Phe-
5 nol- oder Benzylgruppen, und

T einen Mono-, Di- oder Oligosaccharidrest mit bis zu
40 glykosidisch miteinander verknüpften, gegebenen-
falls verzweigten Zuckerresten, die Furanose-
10 und/oder Pyranoseringe darstellen und 5 bis 230 Koh-
lenstoffatome enthalten und N- oder O-glycosidisch an
Polypeptide gebunden sind.

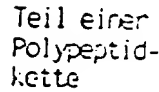
Vorzugsweise bedeuten in der obengenannten allgemeinen
15 Formel (I):

R_2 , R_3 , R_4 und R_5 , die gleich oder verschieden sein kön-
nen, jeweils Wasserstoff, einen linearen oder ver-
zweigten Alkylrest mit 1 bis 7 Kohlenstoffatomen; ei-
20 nen linearen oder verzweigten Alkenylrest mit 3 bis
10 Kohlenstoffatomen; einen linearen oder verzweigten
Alkynylrest mit 3 bis 10 Kohlenstoffatomen; einen Al-
kenyl- bzw. Alkynylrest mit 2 oder mehr Dop-
pelbindungen bzw. Dreifachbindungen mit 7 bis 12 Koh-
25 lenstoffatomen; einen Phenylrest; einen linearen oder
verzweigten, gesättigten oder ein- oder mehrfach un-
gesättigten Acylrest ($-\text{CO}-R_1$) mit insgesamt 1 bis 7
Kohlenstoffatomen, insbesondere Acetylrest, ein-
schließlich seiner ein- oder mehrfach hydroxylierten
30 Analoga; einen Aroylrest mit 6 bis 10 Kohlenstoffato-
men; einen Carbonylamidrest der Formel $-\text{CONH}_2$ oder $-\text{CONHR}_1$;
einen linearen oder verzweigten, gesättigten
oder ein- oder mehrfach ungesättigten Thioacylrest ($-\text{CS}-R_1$)
mit insgesamt 1 bis 7 Kohlenstoffatomen; oder
35 einen Thiocarbamidrest der Formel $-\text{CS}-\text{NH}_2$ oder $-\text{CS}-\text{NHR}_1$;
wobei R_1 jeweils für Wasserstoff oder einen li-
nearen oder verzweigten, gesättigten oder ein- oder

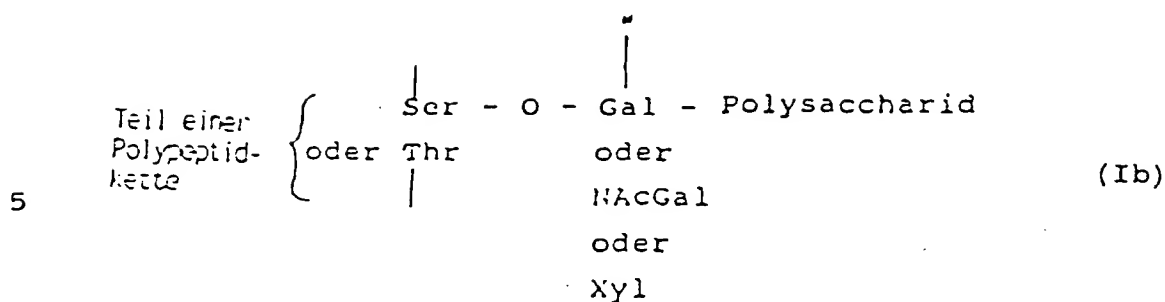
5

10

15



BNSDOCID: <DE_29820466U1 | >



worin bedeuten:

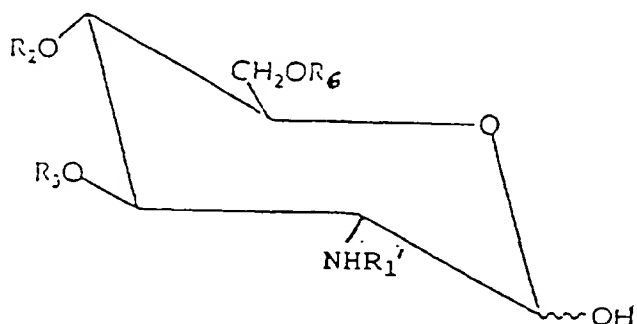
- 10 Gal = Galactose
 Thr = Threonin
 Ser = Serin
 Xyl = Xylose
 NAcGal = N-Acetyl-galactosamin
 15 * = T-Verknüpfungsstelle,

wobei in den obigen Formeln (Ia) und (Ib) die Galactose (Gal) ersetzt sein kann durch 2-Desoxy-galactose oder 2-Desoxy-2-halogenid(F, Cl, Br, J)-galactose.

20

Vorzugsweise steht insbesondere dann, wenn T einen Saccharidrest mit N-Glycanstruktur oder einen Saccharidrest mit O-Glycanstruktur darstellt, GN für einen Rest der allgemeinen Formel (II):

25



30

(II)

in der R'₁, R₂ und R₃ die vorstehend angegebenen Bedeutungen haben, R₆ die gleichen Bedeutungen wie R₂ und R₃ hat und -NHR'₁ neben der äquatorialen Position auch die axiale Position einnehmen kann, und wobei außerdem bei äquatoria-

ler Position von $-NHR'_1$ $-OR_2$ in axialer Position stehen kann, und in der eine oder mehrere oder alle der Gruppen $-OR_2$, $-OR_3$, $-OR_6$ und/oder die freie OH-Gruppe acyliert sein können durch einen linearen oder verzweigten, gesättigten oder ein- oder mehrfach ungesättigten Acylrest ($-CO-R_1$) mit insgesamt 1 bis 20, vorzugsweise 1 bis 7 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise durch den Acetylrest ($-CO-CH_3$), einschließlich seiner ein- oder mehrfach hydroxylierten Analoga.

10

Die oben angegebenen Reste R_1 bis R_6 stehen vorzugsweise für H oder CH_3 oder (C_1-C_7) -Acyl, insbesondere Acetyl.

In der NHR'_1 -Gruppe steht R'_1 vorzugsweise für einen (C_3-C_7) -Acylrest, ausgewählt aus der Gruppe Propanoyl, Isopropanoyl, Pivaloyl bzw. Pivanoyl (tert-Butyl-carbonyl), Cyclopropanoyl, Butanoyl, Pentanoyl, Hexanoyl, Heptanoyl, Crotonoyl und Lävulinoyl, und/oder einen (C_3-C_7) -Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe Propyl, Isopropyl, Pivalyl bzw. tert-Butyl, Cyclopropyl, Butanyl, Pentanyl, Hexanyl, Heptanyl, Crotonyl und Lävulinyl, einschließlich der ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten Analoga davon.

Die vorstehend angegebenen neuen erfindungsgemäßen Verbindungen weisen eine veränderte, insbesondere verlängerte, Pharmakokinetik auf, verglichen mit der biologischen Halblebenszeit (Halbwertszeit) der entsprechenden bekannten und handelsüblichen natürlichen (nativen) Glycoproteine mit $R'_1 = \text{Acetyl}$.

Bei den erfindungsgemäßen neuen Verbindungen handelt es sich vorzugsweise um

rekombinante Glycoproteine, speziell um rekombinante Human-Glycoproteine (rh Glycoproteine), vorzugsweise um rh Differenzierungsfaktoren, insbesondere rh Erythropoietin;

- um rh Wachstumsfaktoren, insbesondere rh CSF (Colony-Stimulating-Factor), rh GMCSF (Granulocyten-Monocyten-Stimulationsfaktor);
- um rh Thrombolytika, insbesondere rh Tissue-Plasminogen-
5 Activator (tPA) und rh Urokinase;
- um rh Thromboprophylaktika, insbesondere rh Antithrombin III;
- um rh Gerinnungsfaktoren, insbesondere den rh Faktor VIII und rh Faktor IX;
- 10 um rh Interferone, insbesondere rh α -, β - und γ -Interferone; und
- um rh Interleukine, insbesondere rh IL-2, IL-15, IL-16 und IL-17.
- 15 Die vorstehende definierten erfindungsgemäßen neuen rekombinanten Glycoproteine, insbesondere rh Glycoproteine, stellen neue Substanzklassen dar, die als potente Wirkstoffe zur Behandlung von Krankheiten eingesetzt werden können, an denen Zellen der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr, Tumorzellen, Leukozyten, Thrombozyten
20 und Gefäßendothelzellen beteiligt sind. Die erfindungsgemäßen neuen Verbindungen können gezielt über eine Modulation Membran-ständiger Rezeptoren wirken, die an der Regulation des Wachstums und der Differenzierung sowie der Adhäsion von Zellen des Immunsystems, von Tumoren und von Gefäßen beteiligt sind. Eine Immunstimulation ist notwendig bei Heilungsprozessen infektiöser und tumorbedingter Erkrankungen. Außerdem verhindern die erfindungsgemäßen neuen Verbindungen die Adhäsion von Leukozyten oder Tumorzellen auf Gefäßendothelzellen bei septischem Schock oder
30 bei der Metastasierung. Die Verabreichung dieser Substanzen, kann aufgrund ihrer veränderten, vorzugsweise verlängerten, biologischen Halbwertszeit in einer deutlich verminderten Dosierung erfolgen. Bei Verwendung ihrer an den
35 OH-Gruppen des Monosaccharidrestes acylierten, insbesondere acetylierten, Derivate kann die Dosierung bis auf etwa die Hälfte weiter herabgesetzt werden kann. Die erfin-

5 dungsgemäßen neuen rekombinanten Glycoproteine können als Stimulantien für Zellen des Immunsystems eingesetzt werden. Dadurch ist eine beträchtliche Stärkung des Immunsystems bei immungeschwächten Organismen möglich. Sie zeichnen sich durch eine hohe Zell-Spezifität und geringe bis vollständig fehlende Nebenwirkungen, sowie eine hohe Stabilität, insbesondere biologische Stabilität, aus.

10 Die Erfindung wird nachstehend unter Bezugnahme auf das spezifische Glycoprotein rh Erythropoietin näher erläutert, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein. Selbstverständlich gelten die nachstehenden Ausführungen, wie für den Fachmann ohne weiteres ersichtlich, auch für die anderen, oben aufgezählten neuen rekombinanten Glycoproteine
15 der Erfindung.

Humanes Erythropoietin (EPO) ist ein Glycoprotein mit 166 Aminosäuren, 3 Glycosylierungsstellen an den Aminosäure-Positionen 34, 38 und 83 und einem Molekulargewicht von
20 etwa 34 000 bis 38 000. Der Anteil der Glycosyl-Seitenketten am Molekulargewicht beträgt etwa 40 % (vgl. Jacobs et al, "Nature" 313, 806-809 (1985); und Dordal et al, "Endocrinology" 116, 2293-2299 (1985)). EPO wird in der Niere gebildet und zu seinem physiologischen Wirkort, dem
25 Knochenmark, über den Blutweg transportiert.

EPO läßt sich entweder aus natürlichen Quellen, wie menschlichem Urin, isolieren (vgl. z.B. Miyake et al, "J. Biol. Chem.", 252, 5558-5564 (1977)), oder es kann auf
30 gentechnischem Wege hergestellt werden (vgl. z.B. EP-A-0 148 605 und 0 267 678). Seine physiologische Funktion besteht in der Stimulation der Erythropoese, d.h. es stimuliert Wachstum und Differenzierung von Erythrozyten-Vorläuferzellen. Es wird in großem Umfang als Heilmittel
35 für Anämie-Patienten, für postoperative Patienten und Patienten, die nach einer Nierenexstirpation eine Hemodialyse erhalten, angewendet. In erster Linie dient es der

Therapie renal bedingter Anämien, d.h. für Anämien, die durch die Einschränkung oder den Verlust der Funktion der Nieren entstanden sind. Der Funktionsverlust der Nieren kann verschiedene Ursachen haben, beispielsweise Minder-
5 durchblutung, chronische Entzündungen, Traumata, Exstirpation, hepatorhenales Syndrom und durch diese Erkrankungen bedingte Dialysemaßnahmen.

Es ist bereits ein Verfahren zum Isolieren von EPO aus
10 menschlichem Urin, der EPO enthält, bekannt (vgl. z.B. US-Patent 3 865 801). Da jedoch der Gehalt an EPO in üblichem menschlichem Urin extrem niedrig ist und in der Größenordnung von etwa 0,01 bis 0,02 Gew.-% des gesamten Proteins in dem Urin liegt, ist es schwierig, EPO auf diesem Wege
15 effektiv herzustellen. Es ist auch bereits ein Verfahren aus EP 0 116 446 bekannt, nach dem hochreines Erythropoietin hergestellt werden kann und in dem ein Polypeptid als Antikörper verwendet wird. Diese Druckschrift enthält jedoch keine Angaben über die dabei erzielbaren Ausbeuten
20 und dieses Verfahren ist verhältnismäßig schwierig durchführbar.

Seit einigen Jahren ist das Gen für menschliches EPO bekannt, das aus einer foetalen Leber-Genbank isoliert und
25 charakterisiert werden konnte. Es steht seit 1985 für gentechnologische Untersuchungen zur Verfügung (vgl. Jacobs et al, "Nature" 313, 806-809 (1985)). EPO kann mit Hilfe gentechnologischer Verfahren in tierischen Zellen exprimiert werden.

30

Das erfindungsgemäße neue rekombinante EPO kann (ebenso wie die übrigen obengenannten neuen rekombinanten Glycoproteine) auf gentechnischem Wege hergestellt werden, indem man von reinem Erythropoietin aus einem Erythropoietin
35 enthaltenden Material ausgeht, das aus Zellkulturüberständen gewonnen wurde. Als Kulturzellen werden eucaryote, vor allem tierische Zellen, insbesondere nicht-transformierte

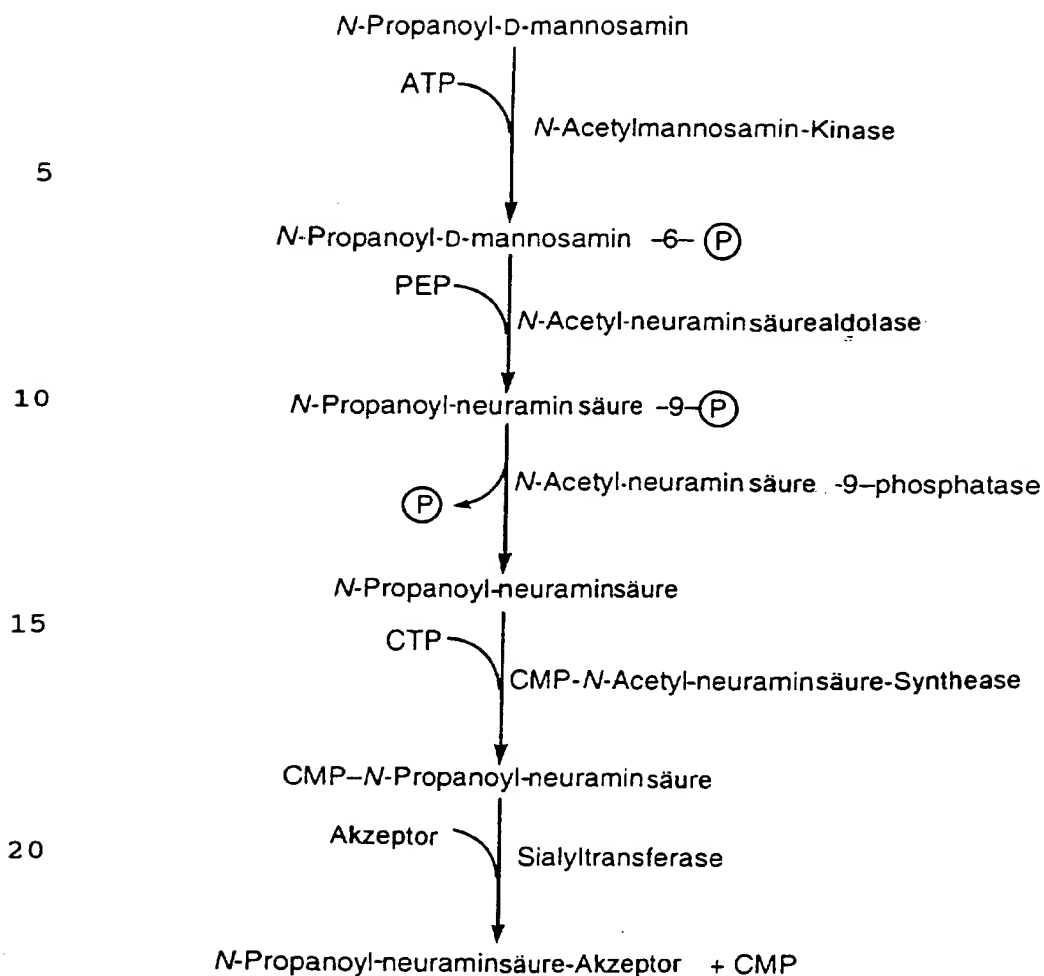
- und transformierte CHO-Zellen oder COS7-Zellen oder Nalm-Zellen oder Fibroblaste eingesetzt, die in einem üblichen Kulturmedium, vorzugsweise in einem FCS-, RPMI 1640-, HAT-, Eagle-MEM-, Dulbecco-MEM- und/oder Glasgow-MEM-Medium, das als Glycanvorläufer ein N-(C₃-C₇)-acyliertes und/oder N-(C₃-C₇)-hydrocarbyliertes Monosaccharid für die Biosynthese enthält, in an sich bekannter Weise gezüchtet und das dabei erhaltene rh EPO gegebenenfalls auf ebenfalls an sich bekannte Weise (vgl. "Organicum") an den OH-Gruppen des Monosaccharid-Restes vorzugsweise mittels eines geeigneten Säureanhydrids, insbesondere mittels Essigsäureanhydrid, ein- oder mehrfach oder vollständig acyliert bzw. vorzugsweise acetyliert wird.
- 15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist gemäß einem weiteren Aspekt ein Verfahren zur Herstellung der weiter oben definierten neuen rekombinanten Glycoproteine der Erfindung aus einem ein oder mehrere rekombinante Glycoproteine, insbesondere rekombinante Human-Glycoproteine, enthaltenden Material, das aus Zellkulturüberständen gewonnen wurde, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man als Kulturzellen eukaryote, vorzugsweise tierische Zellen, besonders bevorzugt nicht-transformierte oder transformierte CHO-Zellen oder COS7-Zellen oder Nalm-Zellen oder Fibroblaste, in einem üblichen Kulturmedium, das als Glycanvorläufer ein N-(C₃-C₇)-acyliertes und/oder N-(C₃-C₇)-hydrocarbyliertes Monosaccharid für die Biosynthese der Aminosäuren in einer Konzentration von 0,001 bis 50 mMol/l, vorzugsweise von 0,5 bis 20 mMol/l, enthält, bei einer Temperatur von 18 bis 40°C, vorzugsweise von 30°C, und bei einem pH-Wert von 6,0 bis 8,2, vorzugsweise von 7,2, in an sich bekannter Weise kultiviert und das dabei erhaltene N-Acylderivat bzw. N-Hydrocarbylderivat des Glycoproteins in an sich bekannter Weise abtrennt und gewinnt und gegebenenfalls auf an sich bekannte Weise an den OH- bzw. OR-Gruppen des Monosaccharids vorzugsweise mittels eines geeigneten Säureanhydrids, insbesondere mittels Essigsäureanhydrid, ein-

oder mehrfach oder vollständig acyliert bzw. vorzugsweise acetyliert.

Als Kulturmedium wird vorzugsweise ein FCS-, RPMI 1640-,
5 HAT-, Eagle-MEM-, Dulbecco-MEM- und/oder Glasgow-MEM-Medium verwendet.

Als Glycanvorläufer verwendet man vorzugsweise N-(C₃-C₇)-Acyl- und/oder N-(C₃-C₇)-Hydrocarbyl-, insbesondere N-
10 Propanoyl-, N-Isopropanoyl, N-Pivaloyl- bzw. N-Pivanoyl (N-tert-Butylcarbonyl), N-Cyclopropanoyl-, N-Butanoyl-, N-Pentanoyl-, N-Hexanoyl-, N-Heptanoyl-, N-Crotonoyl-, N-Lävulinoyl-, und/oder N-Propyl-, N-Isopropyl-, N-Pivalyl- bzw. N-tert-Butyl-, N-Cyclopropyl-, N-Butanyl-, N-Penta-
15 nyl-, N-Hexanyl-, N-Heptanyl-, N-Crotonyl- und N-Lävuliny-D-glucosamin, -D-galactosamin oder -neuraminsäure, insbesondere -D-mannosamin, oder eine Mischung davon.

Eines der wesentlichen Merkmale des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß ein Zellkulturmedium verwendet
20 wird, das als Glycanvorläufer ein N-acyliertes Monosaccharid für die Biosynthese der Aminosucker enthält, beispielsweise N-Propanoyl-D-glucosamin oder N-Propanoyl-D-galactosamin, die dazu geeignet sind, N-Acetyl-D-glucosamin oder N-Acetyl-D-galactosamin oder N-Acetyl-neuramin-
25 säure durch N-Propanoyl-D-glucosamin oder N-Propanoyl-D-galactosamin oder N-Propanoyl-neuraminsäure in der Glycankette des aus den Kulturzellen sezernierten EPO zu ersetzen. Als besonders wirkungsvoll haben sich direkte Vorläufer der Neuraminsäure erwiesen, nämlich N-Propanoyl-D-mannosamin oder N-Butanoyl-D-mannosamin oder N-Pentanoyl-D-mannosamin oder N-Hexanoyl-D-mannosamin oder N-Cyclopropanoyl-D-mannosamin oder ein Gemisch aus diesen Zuckern. Der Stoffwechselweg dieser Aminosuckeranaloga ist
35 aufgeklärt (vgl. Kayser et al, "J. Biol. Chem." 267, 16934-16938 (1992)), und nachstehend für N-Propanoyl-D-mannosamin wiedergegeben:



25

wobei in der obengenannten Reaktionsfolge bedeuten:

ATP	Adenosintriphosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
30 P	Phosphat
CTP	Cytidintriphosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
Akzeptor	ein Protein, das sich im Zustand der Glycosylierung befindet.

35

Für die Glycosylierung von Proteinen werden die folgenden Monosaccharide benötigt: N-Acetyl-D-glucosamin, N-Acetyl-

D-galactosamin, D-Mannose, D-Galactose, L-Fucose, N-Acetyl-D-mannosamin und N-Acetyl-neuraminsäure, die in typischer Weise miteinander verknüpft sind (vgl. E. Buddecke, "Grundriß der Biochemie", 9. Auflage, S. 185 ff.

5 (1994)).

Die zu Oligosacchariden (Glycanen) miteinander verknüpften Monosaccharide sind mit dem Polypeptid entweder über die Aminosäure Asparagin in der typischen Tripeptid-Sequenz-
10 Asparagin-beliebige Aminosäure(ausgenommen Prolin)-Serin oder Threonin oder Cystein-N-glycosidisch verknüpft (N-Glycane) oder sie sind über Serin O-glycosidisch verknüpft (O-Glycane). In diesen Glycanen können N-Acetyl-D-glycosamin durch N-Propanoyl-D-glucosamin und/oder N-
15 Acetyl-D-galactosamin durch N-Propanoyl-D-galactosamin ersetzt werden oder durch homologe Verbindungen wie N-Isopropanoyl-, N-Pivaloyl- (d.h. N-tert-Butylcarbonyl)-, N-Cyclopropanoyl-, N-Butanoyl-, N-Pentanoyl-, N-Hexanoyl-, N-Heptanoyl-, N-Crotonoyl- oder N-Lävulinoyl-Monosaccharid
20 oder die entsprechenden (C₃-C₇)-Hydrocarbyl-Derivate ersetzt werden. Im Falle des terminalen Zuckers N-Acetyl-neuraminsäure findet ein Ersatz durch die N-Propanoyl- oder N-Butanoyl- oder Pentanoyl- oder N-Hexanoyl- oder N-Cyclopropanoyl- oder N-Isopropanoyl-, oder N-Pivaloyl-
25 oder N-Lävulinoyl-neuraminsäure statt.

Das von den Zellen synthetisierte und sezernierte EPO enthält durch die Einführung eines oder mehrerer dieser Zuck-
keranaloga, die einzeln oder als Gemisch dem Zellkulturme-
30 dium zugesetzt werden können, eine neue Struktur, in der die nativen Monosaccharide durch neue, chemisch modifizierte Monosaccharide ersetzt sind. Die dabei erhaltenen Gesamt-Verbindungen stellen neue Verbindungen dar.

35 Diese metabolisch modifizierten neuen Erythropoietine weisen neue biologische Eigenschaften auf, insbesondere besitzen sie eine höhere biologische Stabilität. Erklärt

wird dies derzeit dadurch, daß es bekannt ist, daß Glycoproteine terminale N-Acetyl-neuraminsäure-Reste enthalten, die mit D-Galactose verknüpft sind (vgl. A. Rosenberg, "Biology of Sialic Acids", Plenum Press, New York und London, Seiten 7-67 (1995)). Ihre Funktion in dieser Verknüpfung besteht darin, diese Galactose vor Zellen und deren Galactose-spezifische Rezeptoren gegen Erkantwerden zu schützen, was durch die Untersuchungen von G. Ashwell in der obengenannten Schauer-Literaturstelle gezeigt werden konnte. Wenn diese terminalen Galactosen in Glycoproteinen erkannt worden sind, werden die erkannten Glycoproteine, die somit keine N-Acetyl-neuraminsäure mehr tragen, dem intrazellulären Abbau zugeführt. Diese für die biologische Stabilität essentielle N-Acetyl-neuraminsäure unterliegt einem natürlichen Turnover. Er wird im wesentlichen durch spezifische Neuraminidasen (oder Sialidasen) bestimmt, welche die N-Acetyl-neuraminsäure abspalten. Dadurch kommt es zur Alterung dieser Glycoproteine und sie werden dem natürlichen Abbau zugeführt. Diese Neuraminidasen benötigen für ihre volle Aktivität die N-Acetylgruppe in der N-Acetyl-neuraminsäure.

In den erfindungsgemäßen neuen EPO-Verbindungen ist die natürliche N-Acetylgruppe durch homologe N-(C₃-C₇)-Acylgruppen und/oder homologe N-(C₃-C₇)-Hydrocarbylgruppen ersetzt, beispielsweise durch die N-Propanoylgruppe. Aber auch die obengenannten weiteren N-Acyl- und N-Hydrocarbyl-Gruppen sind wirksame Ersatzgruppen. Der Ersatz der N-Acetyl-neuraminsäure durch die obengenannten homologenen N-Acyl- bzw. N-Hydrocarbyl-Verbindungen führt daher zu einer verminderten Affinität der Neuraminidasen gegenüber diesen modifizierten N-Acyl- bzw. N-Hydrocarbyl-neuraminsäuren. Dadurch wird die modifizierte Neuraminsäure in einer weit geringeren Rate abgespalten, sie bleibt länger mit dem Hydroprotein verbunden und kann länger die erwünschte Schutzfunktion ausüben. Dadurch wird das Glycoprotein biologisch stabiler. Das bedeutet, daß parenteral

verabreichtes, in der vorstehend beschriebenen Weise modifiziertes EPO länger im Organismus verbleiben kann. Es ist somit länger aktiv. Dadurch kann die EPO-Dosierung herabgesetzt werden, da das erfindungsgemäß modifizierte EPO

5 die gleiche biologische Aktivität bezüglich der Blutneubildungs-Stimulation aufweist wie natives EPO. Außerdem ist das erfindungsgemäß modifizierte EPO stabiler.

Die vorstehende Beschreibung des ablaufenden biologischen

10 Mechanismus bei der Herstellung und Verabreichung von rh Erythropoietin gilt natürlich auch für die anderen erfindungsgemäßen rekombinanten Glycoproteine, d.h. auch für die obengenannten Gerinnungsfaktoren, Interferone, Interleukine, Wachstumsfaktoren, Thrombolytika und Thromboprophylaktika.

15

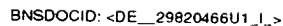
Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung insbesondere die folgenden Verbindungen:

20 rekombinantes Human-Erythropoietin (rh Erythropoietin) für die Behandlung von Anämien, in dem die natürliche N-Acetyl-Gruppe der Glycan-Reste, insbesondere der terminalen N-Acetylneuraminsäure-Reste, durch einen N-(C₃-C₇)-Acylrest, ausgewählt aus der Gruppe N-Propanoyl, N-

25 Isopropanoyl, N-Pivaloyl bzw. N-Pivanoyl (N-tert-Butylcarbonyl), N-Cyclopropanoyl, N-Butanoyl, N-Pentanoyl, N-Hexanoyl, N-Heptanoyl, N-Crotonoyl und N-Lävulinoyl und/oder einen N-(C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe N-Propyl, N-Isopropyl, N-Pivalyl bzw. N-tert-

30 Butyl, N-Cyclopropyl, N-Butanyl, N-Pentanyl, N-Hexanyl, N-Heptanyl, N-Crotonyl und N-Lävulinyl, einschließlich der ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten, Analoga davon ersetzt ist.

35 Die erfindungsgemäßen neuen rh Erythropoietine weisen vorzugsweise einen Glycan-Rest auf, der ausgewählt wird aus der folgenden Gruppe:



worin Ac in den NeuAc-Resten und/oder ein oder mehrere oder alle Ac in den übrigen Resten jeweils ersetzt ist (sind) durch einen (C₃-C₇)-Acylrest und/oder (C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe Propanoyl, Iso-
5 propanoyl, Pivaloyl bzw. Pivanoyl (tert-Butylcarbonyl), Cyclopropanoyl, Butanoyl, Pentanoyl, Hexanoyl, Heptanoyl, Crotonoyl; Lävulinoyl, Propyl, Isopropyl, Pivalyl bzw. tert-Butyl, Cyclopropyl, Butanyl, Pentanyl, Hexanyl, Heptanyl, Crotonyl und Lävulinyll; einschließlich der ein-
10 oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten Analoga davon.

Weitere bevorzugte erfindungsgemäße rh Glycoproteine sind folgende:

15 rh Wachstumsfaktoren, insbesondere rh GCSF und/oder rh GMCSF, für die Behandlung von Erkrankungen des Blutzellenbildenden Systems, insbesondere der Agranulocytose oder Thrombopenie, vor allem zur Stimulierung des Wachstums von
20 weißen Blutzellen, insbesondere Lymphocyten, Granulocyten und Monocyten, in denen die natürliche N-Acetyl-Gruppe der Glycan-Reste, insbesondere der terminalen N-Acetylneuraminsäure-Reste, durch einen N-(C₃-C₇)-Acylrest, ausgewählt aus der Gruppe N-Propanoyl, N-Isopropanoyl, N-Pivaloyl
25 bzw. N-Pivanoyl (N-tert-Butylcarbonyl), N-Cyclopropanoyl, N-Butanoyl, N-Pentanoyl, N-Hexanoyl, N-Heptanoyl, N-Crotonoyl und N-Lävulinoyl, und/oder einen N-(C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe N-Propyl, N-Isopropyl, N-Pivalyl bzw. tert-Butyl, N-Cyclopropyl, N-
30 Butanyl, N-Pentanyl, N-Hexanyl, N-Heptanyl, N-Crotonyl und N-Lävulinyll, einschließlich der ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten Analoga davon, ersetzt ist;

rh Thrombolytika, insbesondere rh tPA oder rh Urokinase,
35 für die Behandlung von Thromben oder zur Prophylaxe der Thrombenbildung, in denen die natürliche N-Acetyl-Gruppe der Glycan-Reste, insbesondere der terminalen N-Acetylneu-

raminsäure-Reste, durch einen N-(C₃-C₇)-Acylrest, ausgewählt aus der Gruppe N-Propanoyl, N-Isopropanoyl, N-Pivaloyl bzw. N-Pivanoyl (N-tert-Butylcarbonyl), N-Cyclopropanoyl, N-Butanoyl, N-Pentanoyl, N-Hexanoyl, N-Heptanoyl, N-Crotonoyl und N-Lävulinoyl und/oder einen N-(C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe Propyl, Isopropyl, Pivalyl bzw. tert-Butyl, Cyclopropyl, Butanyl, Pentanyl, Hexanyl, Heptanyl, Crotonyl und Lävulinyl, einschließlich der ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten Analoga, davon ersetzt ist;

rh Thromboprophylaktika, insbesondere rh Antithrombin III, zur Prophylaxe der Thrombenbildung, in denen die natürliche N-Acetyl-Gruppe der Glycan-Reste, insbesondere der terminalen N-Acetylneuraminsäure-Reste, durch einen N-(C₃-C₇)-Acylrest, ausgewählt aus der Gruppe N-Propanoyl, N-Isopropanoyl, N-Pivaloyl bzw. N-Pivanoyl (N-tert-Butylcarbonyl), N-Cyclopropanoyl, N-Butanoyl, N-Pentanoyl, N-Hexanoyl, N-Heptanoyl, N-Crotonoyl und N-Lävulinoyl, und/oder einen N-(C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe Propyl, Isopropyl, Pivalyl bzw. tert-Butyl, Cyclopropyl, Butanyl, Pentanyl, Hexanyl, Heptanyl, Crotonyl und Lävulinyl, einschließlich der ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten Analoga, davon ersetzt ist;

rh Gerinnungsfaktoren, insbesondere den rh Faktor VIII und/oder den rh Faktor IX, für die Behandlung von Störungen des Gerinnungssystems, die durch einen erblichen oder erworbenen Mangel an Faktor VIII und/oder Faktor IX bedingt sind, in denen die natürliche N-Acetyl-Gruppe der Glycan-Reste, insbesondere der terminalen N-Acetylneuraminsäure-Reste, durch einen N-(C₃-C₇)-Acylrest, ausgewählt aus der Gruppe N-Propanoyl, N-Isopropanoyl, N-Pivaloyl bzw. N-Pivanoyl (N-tert-Butylcarbonyl), N-Cyclopropanoyl, N-Butanoyl, N-Pentanoyl, N-Hexanoyl, N-Heptanoyl, N-Crotonoyl und N-Lävulinoyl, und/oder einen N-



(C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe Propyl, Isopropyl, Pivalyl bzw. tert-Butyl, Cyclopropyl, Butanyl, Pentanyl, Hexanyl, Heptanyl, Crotonyl und Lävulinyl, einschließlich der ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten Analoga, davon ersetzt ist;

rh Interferone, insbesondere rh α -Interferon-Verbindungen, für die Behandlung von bösartigen Tumoren, insbesondere Melanomen, und von Autoaggressionskrankheiten, in denen die natürliche N-Acetyl-Gruppe der Glycan-Reste, insbesondere der terminalen N-Acetylneuraminsäure-Reste, durch einen N-(C₃-C₇)-Acylrest, ausgewählt aus der Gruppe N-Propanoyl, N-Isopropanoyl, N-Pivaloyl bzw. N-Pivanoyl (N-tert-Butylcarbonyl), N-Cyclopropanoyl, N-Butanoyl, N-Pentanoyl, N-Hexanoyl, N-Heptanoyl, N-Crotonoyl und N-Lävulinoyl, und/oder einen N-(C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe Propyl, Isopropyl, Pivalyl bzw. tert-Butyl, Cyclopropyl, Butanyl, Pentanyl, Hexanyl, Heptanyl, Crotonyl und Lävulinyl, einschließlich der ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten Analoga davon, ersetzt ist;

rh Interferone, insbesondere rh β -Interferon-Verbindungen, für die Behandlung aller Formen der multiplen Sklerose und Viruserkrankungen, vor allem der Virushepatitis B, der Virushepatitis C, der Virushepatitis D und Viruszephalitiden, in denen die natürliche N-Acetyl-Gruppe der Glycan-Reste, insbesondere der terminalen N-Acetylneuraminsäure-Reste, durch einen N-(C₃-C₇)-Acylrest, ausgewählt aus der Gruppe N-Propanoyl, N-Isopropanoyl, N-Pivaloyl bzw. N-Pivanoyl (N-tert-Butylcarbonyl), N-Cyclopropanoyl, N-Butanoyl, N-Pentanoyl, N-Hexanoyl, N-Heptanoyl, N-Crotonoyl und N-Lävulinoyl und/oder einen N-(C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe Propyl, Isopropyl, Pivalyl bzw. tert-Butyl, Cyclopropyl, Butanyl, Pentanyl, Hexanyl, Heptanyl, Crotonyl und Lävulinyl, ein-

schließlich der ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten Analoga davon, ersetzt ist;

rh Interferone, insbesondere rh γ -Interferon-Verbindungen,
5 für die Behandlung von bösartigen Tumoren, der Virushepatitis B, der Virushepatitis C, der Virushepatitis D und von Viruszephalitiden, in denen die natürliche N-Acetyl-Gruppe der Glycan-Reste, insbesondere der terminalen N-Acetylneuraminsäure-Reste, durch einen N-(C₃-C₇)-Acylrest,
10 ausgewählt aus der Gruppe N-Propanoyl, N-Isopropanoyl, N-Pivaloyl bzw. N-Pivanoyl (N-tert-Butylcarbonyl), N-Cyclopropanoyl, N-Butanoyl, N-Pentanoyl, N-Hexanoyl, N-Heptanoyl, N-Crotonoyl und N-Lävulinoyl, und/oder einen N-(C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe Propyl,
15 Isopropyl, Pivalyl bzw. tert-Butyl, Cyclopropyl, Butanyl, Pentanyl, Hexanyl, Heptanyl, Crotonyl und Lävulinyl, einschließlich der ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten Analoga davon ersetzt ist; und

20 rh Interleukine, insbesondere rh IL-2, rh IL-15, rh IL-16 und rh IL-17, für die Behandlung von bösartigen metastasierenden Tumoren, insbesondere Melanomen, in denen die natürliche N-Acetyl-Gruppe der Glycan-Reste, insbesondere der terminalen N-Acetylneuraminsäure-Reste, durch einen N-(C₃-C₇)-Acylrest, ausgewählt aus der Gruppe N-Propanoyl, N-Isopropanoyl, N-Pivaloyl bzw. N-Pivanoyl (N-tert-Butylcarbonyl), N-Cyclopropanoyl, N-Butanoyl, N-Pentanoyl, N-Hexanoyl, N-Heptanoyl, N-Crotonoyl und N-Lävulinoyl, und/oder einen N-(C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe Propyl, Isopropyl, Pivalyl bzw.
30 tert-Butyl, Cyclopropyl, Butanyl, Pentanyl, Hexanyl, Heptanyl, Crotonyl und Lävulinyl, einschließlich der ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten Analoga davon, ersetzt ist.

35

Bei den erfindungsgemäßen neuen Verbindungen handelt es sich insbesondere um solche, in denen die natürliche N-

- Acetylgruppe des N-Acetyl-D-glucosamins durch N-Propanoyl oder N-Cyclopropanoyl oder N-Isopropanoyl oder N-Pivaloyl bzw. N-Pivanoyl (N-tert-Butylcarbonyl) oder N-Butanoyl oder N-Pentanoyl oder N-Hexanoyl ganz oder teilweise ersetzt worden ist durch biochemische Modulation (Biochemical-Engineering) durch Zugabe des jeweils entsprechenden N-Acyl-D-glucosamin- oder N-Acyl-D-galactosamin- oder N-Acyl-neuraminsäure-, insbesondere N-Acyl-D-mannosamin-Derivats, zu dem Kulturmedium in einer Endkonzentration im Medium von 0,001 bis 50,0 mM, insbesondere 0,5 bis 20 mM, speziell 0,5 bis 5 mM, wobei in dem genannten Kulturmedium die D-Glucose ganz oder teilweise durch D-Galactose ersetzt sein kann; und
- speziell um solche, in denen die natürliche D-Galactose durch 2-Desoxy-D-galactose ganz oder teilweise ersetzt worden ist durch biochemische Modulation (Biochemical-Engineering) durch Zugabe von 2-Desoxy-D-galactose zu dem Kulturmedium in einer Endkonzentration im Medium von 0,001 bis 50 mM, insbesondere 0,5 bis 20 mM, speziell 0,5 bis 5 mM.
- Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung pharmazeutische Mittel, die als Wirkstoff mindestens ein rh Glucosamin, wie es vorstehend definiert worden ist, gegebenenfalls in Kombination mit anderen Wirkstoffen sowie üblichen pharmazeutischen Trägern und/oder Hilfsstoffen, enthalten.
- Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel als Wirkstoff ein oder mehrere rekombinante Glycoproteine, insbesondere rekombinante Human-Glycoproteine oder ein Gemisch unterschiedlich modifizierter N-(C₃-C₇)-Acyl- und/oder N-(C₃-C₇)-Hydrocarbyl-Derivate davon.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel enthalten den rh Glycoprotein-Wirkstoff, der vorzugsweise am Monosaccharid ein- oder mehrfach acyliert, insbesondere acetyliert, ist, vorzugsweise in einer Menge von 0,001 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise von 0,1 bis 20 Gew.-%, speziell von 2 bis 10 Gew.-%.

Besonders bevorzugte pharmazeutische Mittel der Erfindung sind solche, die als rh Glycoprotein-Wirkstoff enthalten:

10 rekombinantes Human-Erythropoietin oder Derivate davon, wie sie vorstehend definiert sind;

rh Wachstumsfaktoren, insbesondere rh CGSF und/oder rh
15 GMCSF, wie sie vorstehend definiert sind;

rh Thrombolytika, insbesondere rh tPA oder rh Urokinase, wie sie vorstehend definiert sind;

20 rh Thromboprophylaktika, insbesondere rh Antithrombin III, wie sie vorstehend definiert sind;

rh Gerinnungsfaktoren, insbesondere den rh Faktor VIII und/oder den rh Faktor IX, wie sie vorstehend definiert
25 sind;

rh Interferone, insbesondere rh α -, β - und γ -Interferone, wie sie vorstehend definiert worden sind; oder

30 rh Interleukine, insbesondere rh IL-2, rh IL-15, rh IL-16 und rh IL-17, wie sie vorstehend definiert worden sind.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung

35 die Verwendung von rekombinantem Human-Erythropoietin und seinen Derivaten, wie es vorstehend definiert worden ist,

für die Behandlung von Anämien, insbesondere renal bedingten Anämien, in einer Dosierung von 0,001 bis 200 mg/kg Körpergewicht;

- 5 die Verwendung der rh Wachstumsfaktoren, wie sie vorstehend definiert worden sind, für die Behandlung von Erkrankungen des Blutzellen-bildenden Systems, insbesondere der Agranulozytose oder Thrombopenie, vor allem zur Stimulierung des Wachstums von weißen Blutzellen, insbesondere
- 10 Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten, in einer Dosierung von 0,001 bis 1,0 mg/kg Körpergewicht;

- die Verwendung der rh Thrombolytika, wie sie vorstehend definiert worden sind, für die Behandlung von Thromben
- 15 oder zur Prophylaxe der Thrombenbildung in einer Dosierung von 1 bis 200 mg/kg Körpergewicht, vorzugsweise von 50 bis 100 mg/kg Körpergewicht;

- die Verwendung der rh Thromboprophylaktika, wie sie vorstehend definiert worden sind, zur Prophylaxe der Thrombenbildung in einer Dosierung von 1 bis 200 mg/kg Körpergewicht, vorzugsweise von 50 bis 100 mg/kg, Körpergewicht;
- 20

- die Verwendung der rh Gerinnungsfaktoren, wie sie vorstehend definiert worden sind, für die Behandlung von Störungen des Gerinnungssystems, die durch einen erblichen oder erworbenen Mangel an Faktor VIII und/oder Faktor IX bedingt sind, in einer Dosierung von 0,001 bis 200, vorzugsweise von 0,1 bis 50 mg/kg Körpergewicht;
- 25

- 30 die Verwendung der rh α -Interferone, wie sie vorstehend definiert worden sind, für die Behandlung von bösartigen Tumoren, insbesondere Melanomen, und von Autoaggressionskrankheiten in einer Dosierung von 0,001 bis 10 μ g/kg Körpergewicht, insbesondere von 0,01 bis 0,1 μ g/kg Körpergewicht;
- 35

die Verwendung der rh β -Interferone, wie sie vorstehend definiert worden sind, für die Behandlung aller Formen der multiplen Sklerose und von Viruserkrankungen, vor allem der Virushepatitis B, der Virusheptatitis C, der Virushep-
5 tatitis D und Viruszephalitiden in einer Dosierung von 0,001 bis 10 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht, insbesondere von 0,01 bis 0,1 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht;

10 die Verwendung der rh γ -Interferone, wie sie vorstehend definiert worden sind, für die Behandlung von bösartigen Tumoren, der Virushepatitis B, der Virusheptatitis C, der Virusheptatitis D und von Viruszephalitiden in einer Dosierung von 0,001 bis 0,1 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht, insbesondere von 0,01 bis 0,1 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht; und

15 die Verwendung der rh Interleukine, wie sie vorstehend definiert worden sind, für die Behandlung von bösartigen metastasierenden Tumoren, insbesondere Melanomen, in einer Dosierung von 0,001 bis 200 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht.

20 Die erfindungsgemäßen rh Glucoproteine werden vorzugsweise in einer Form verabreicht, in der die OH- bzw. OR-Gruppen ihres Monosaccharid-Restes ein- oder mehrfach acyliert, vorzugsweise acetyliert, ist, wobei in diesem Fall für die
25 entsprechend acylierten bzw. acetylierten Derivate die Dosierung auf die Hälfte der bei den obengenannten bevorzugten Verwendungen angegebenen Dosierungen herabgesetzt werden kann.

298 20 466.5

H 1278a-Gbm

14.11.98

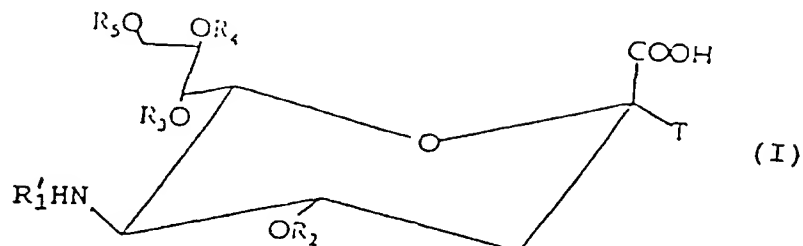
5

S c h u t z a n s p r ü c h e

1. Rekombinante Glycoproteine der allgemeinen Formel (I)

10

15



20

worin bedeuten:

R'_1 einen linearen oder cyclischen, unverzweigten oder verzweigten, gegebenenfalls ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten (C_3 - C_7)-Acylrest, insbesondere (C_3 - C_7)-Alkanoylrest, oder einen linearen oder cyclischen, unverzweigten oder verzweigten, gegebenenfalls ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten (C_3 - C_7)-Hydrocarbylrest, insbesondere (C_3 - C_7)-Alkyl-, -Alkenyl- oder -Alkinylrest,

R_2 , R_3 , R_4 und R_5 , die gleich oder verschieden sein können, jeweils Wasserstoff, einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen (C_nH_{2n+2} , $n = 1$ bis 20); einen linearen oder verzweigten Alkenylrest mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen (C_nH_{2n} , $n = 3$ bis 20, Position der Doppelbindung an

- 5 C_n $n = 2$ bis 19); einen linearen oder verzweigten Alkinylrest mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen (C_nH_{2n-2} , $n = 3$ bis 20, Position der Dreifachbindung an C_n $n = 2$ bis 19); einen Alkenyl- bzw. Alkinylrest mit 2 oder mehr Doppelbindungen bzw. Dreifachbindungen mit 4 bis 20 Kohlenstoffatomen; einen Arylrest mit 6 bis 20 Kohlenstoffatomen; einen linearen oder verzweigten, gesättigten oder ein- oder mehrfach ungesättigten Acylrest ($-CO-R_1$) mit insgesamt 1 bis 20 Kohlenstoffatomen einschließlich seiner ein- oder mehrfach hydroxylierten Analoga; einen Aroylrest mit 6 bis 20 Kohlenstoffatomen; einen Carbonylamidrest der Formel $-CONH_2$ oder $-CONHR_1$; einen linearen oder verzweigten, gesättigten oder ein- oder mehrfach ungesättigten Thioacylrest ($-CS-R_1$) mit insgesamt 1 bis 20 Kohlenstoffatomen; oder einen Thiocarbamidrest der Formel $-CS-NH_2$ oder $-CS-NHR_1$; wobei R_1 jeweils für Wasserstoff oder einen linearen oder verzweigten, gesättigten oder ein- oder mehrfach ungesättigten Alkylrest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und jeder der vorgenannten Reste außer H gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituiert sein kann durch Halogen-, Hydroxy-, Epoxy-, Amino-, Mercaptan-, Phenyl-, Phenol- oder Benzylgruppen, und
- 25 T einen Mono-, Di- oder Oligosaccharidrest mit bis zu 40 glykosidisch miteinander verknüpften, gegebenenfalls verzweigten Zuckerresten, die Furanose- und/oder Pyranoseringe darstellen und 5 bis 230 Kohlenstoffatome enthalten und N- oder O-glycosidisch an
- 30 Polypeptide gebunden sind.

2. Glycoproteine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) bedeuten:

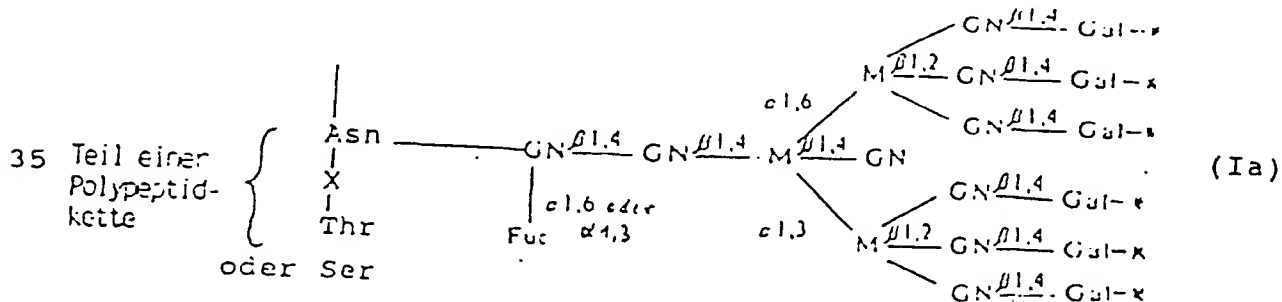
35

R_2 , R_3 , R_4 und R_5 , die gleich oder verschieden sein können, jeweils Wasserstoff, einen linearen oder ver-

5
10
15
20
25

3. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) T steht

30 für einen Saccharidrest mit N-Glycan-Struktur der Formel
(Ia)



1.02.99

worin bedeuten:

Gal = Galactose,

5 GN = N-Acetyl-D-glucosamin,

M = D-Mannose,

Fuc = Fucose,

Asn = Asparagin,

X = eine beliebige Aminosäure außer Prolin,

10 Thr = Threonin,

Ser = Serin,

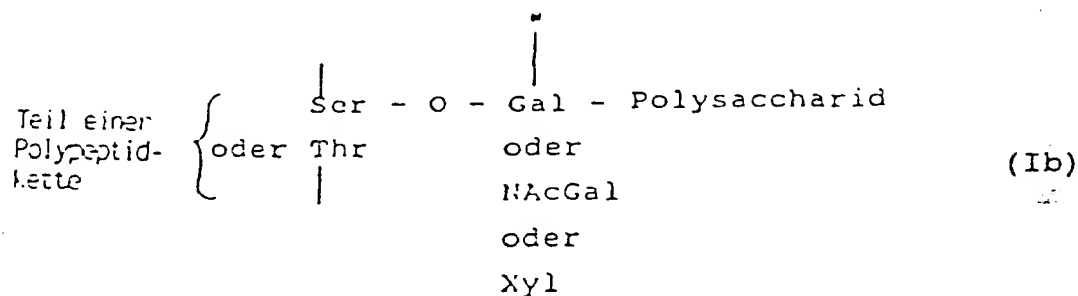
* = T-Verknüpfungsstelle (1 bis 6 Molekülreste),

wobei beide peripheren Reste M durch 1 bis 3 Trisaccharide

15 substituiert sein können; oder

für einen Saccharidrest mit O-Glycan-Struktur der allgemeinen Formel (Ib):

20



25

worin bedeuten:

Gal = Galactose

30 Thr = Threonin

Ser = Serin

Xyl = Xylose

NAcGal = N-Acetyl-galactosamin

* = T-Verknüpfungsstelle,

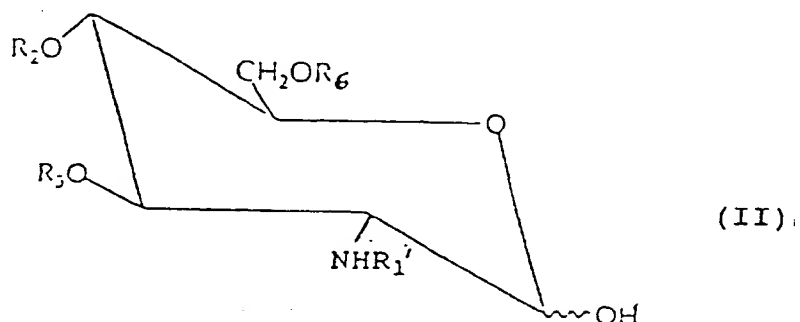
35

wobei in den obigen Formeln (Ia) und (Ib) die Galactose (Gal) ersetzt sein kann durch 2-Desoxy-galactose oder 2-Desoxy-2-halogenid(F, Cl, Br, J)-galactose.

- 5 4. Verbindungen nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß dann, wenn T einen Saccharidrest mit N-Glycanstruktur oder einen Saccharidrest mit O-Glycanstruktur darstellt, GN für einen Rest der allgemeinen Formel (II) steht:

10

15



in der R'_1 , R_2 und R_3 die vorstehend angegebenen Bedeutungen haben, R_6 die gleichen Bedeutungen wie R_2 und R_3 hat und $-NHR'_1$ neben der äquatorialen Position auch die axiale Position einnehmen kann, und wobei außerdem bei äquatorialer Position von $-NHR'_1$ $-OR_2$ in axialer Position stehen kann, und in der eine oder mehrere oder alle der Gruppen $-OR_2$, $-OR_3$, $-OR_6$ und/oder die freie OH-Gruppe acyliert sein können durch einen linearen oder verzweigten, gesättigten oder ein- oder mehrfach ungesättigten Acylrest ($-CO-R_1$) mit insgesamt 1 bis 20, vorzugsweise 1 bis 7 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise durch den Acetylrest ($-CO-CH_3$), einschließlich seiner ein- oder mehrfach hydroxylierten Analoga.

5. Verbindungen nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß R_1 bis R_6 für H oder CH_3 oder (C_1-C_7) -Acyl, insbesondere Acetyl, stehen.

6. Verbindungen nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß in der NHR'₁-Gruppe R'₁ steht für einen (C₃-C₇)-Acylrest, ausgewählt aus der Gruppe Propanoyl, Isopropanoyl, Pivaloyl bzw. Pivanoyl (tert-Butyl-carbonyl), Cyclopropanoyl, Butanoyl, Pentanoyl, Hexanoyl, Heptanoyl, Crotonoyl und Lävulinoyl und/oder einen (C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe Propyl, Isopropyl, Pivalyl bzw. tert-Butyl, Cyclopropyl, Butanyl, Pentanyl, Hexanyl, Heptanyl, Crotonyl und Lävulinyl, einschließlich der ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten Analoga davon.

7. Verbindungen nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine veränderte, insbesondere verlängerte, Pharmakokinetik, verglichen mit der biologischen Halblebenszeit (Halbwertszeit) der entsprechenden bekannten und handelsüblichen natürlichen (nativen) Glycoproteinen mit R'₁ = Acetyl aufweisen.

8. Verbindungen nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es sich dabei handelt um ein rekombinantes Glycoprotein, speziell ein rekombinantes Human-Glycoprotein (rh Glycoprotein), vorzugsweise um rh Differenzierungsfaktoren, insbesondere rh Erythropoietin;
um rh Wachstumsfaktoren, insbesondere rh CSF (Colony-Stimulating-Factor), rh GMCSF (Granulocyten-Monocyten-Stimulationsfaktor);
um rh Thrombolytika, insbesondere rh Tissue-Plasminogen-Activator (tPA) und rh Urokinase;
um rh Thromboprophylaktika, insbesondere rh Antithrombin III;
um rh Gerinnungsfaktoren, insbesondere den rh Faktor VIII und den rh Faktor IX;
um rh Interferone, insbesondere rh α -, β - und γ -Interferone; und

um rh Interleukine, insbesondere rh IL-2, rh IL-15, rh IL-16 und rh IL-17.

9. Verbindungen nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich dabei um rekombinantes Human-Erythropoietin (rh Erythropoietin) für die Behandlung von Anämien handelt, in dem die natürliche N-Acetyl-Gruppe der Glycan-Reste, insbesondere der terminalen N-Acetylneuraminsäure-Reste, durch einen N-(C₃-C₇)-Acylrest, ausgewählt aus der Gruppe N-Propanoyl, N-Isopropanoyl, N-Pivaloyl bzw. N-Pivanoyl (N-tert-Butylcarbonyl), N-Cyclopropanoyl, N-Butanoyl, N-Pentanoyl, N-Hexanoyl, N-Heptanoyl, N-Crotonoyl und N-Lävulinoyl und/oder einen N-(C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe N-Propyl, N-Isopropyl, N-Pivalyl bzw. N-tert-Butyl, N-Cyclopropyl, N-Butanyl, N-Pentanyl, N-Hexanyl, N-Heptanyl, N-Crotonyl und N-Lävulinyl, einschließlich der ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten Analoga davon ersetzt ist.
10. Verbindungen nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Glycan-Rest, ausgewählt aus der folgenden Gruppe, aufweisen:







worin Ac in den NeuAc-Resten und/oder ein oder mehrere oder alle Ac in den übrigen Resten jeweils ersetzt ist (sind) durch einen (C₃-C₇)-Acylrest und/oder (C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe Propanoyl, Iso-
5 propanoyl, Pivaloyl bzw. Pivanoyl (tert-Butylcarbonyl), Cyclopropanoyl, Butanoyl, Pentanoyl, Hexanoyl, Heptanoyl, Crotonoyl; Lävulinoyl, Propyl, Isopropyl, Pivalyl bzw. tert-Butyl, Cyclopropyl, Butanyl, Pentanyl, Hexanyl, Heptanyl, Crotonyl und Lävulinyl; einschließlich der ein-
10 oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten Analoga davon.

11. Verbindungen nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich dabei um rh Wachstumsfaktoren, insbesondere rh GCSF und/oder rh GMCSF, für die Behandlung von Er-
15 krankungen des Blutzellen-bildenden Systems, insbesondere der Agranulocytose oder Thrombopenie, vor allem zur Stimulierung des Wachstums von weißen Blutzellen, insbesondere Lymphocyten, Granulocyten und Monocyten, handelt, in denen
20 die natürliche N-Acetyl-Gruppe der Glycan-Reste, insbesondere der terminalen N-Acetylneuraminsäure-Reste, durch einen N-(C₃-C₇)-Acylrest, ausgewählt aus der Gruppe N-Propanoyl, N-Isopropanoyl, N-Pivaloyl bzw. N-Pivanoyl (N-tert-Butylcarbonyl), N-Cyclopropanoyl, N-Butanoyl, N-Pentanoyl,
25 N-Hexanoyl, N-Heptanoyl, N-Crotonoyl und N-Lävulinoyl, und/oder einen N-(C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe N-Propyl, N-Isopropyl, N-Pivalyl bzw. tert-Butyl, N-Cyclopropyl, N-Butanyl, N-Pentanyl, N-Hexanyl, N-Heptanyl, N-Crotonyl und N-Lävulinyl, einschließlich der
30 ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten Analoga davon ersetzt ist.

12. Verbindungen nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich dabei um rh Thrombolytika, insbesondere rh tPA
35 oder rh Urokinase, für die Behandlung von Thromben oder zur Prophylaxe der Thrombenbildung handelt, in denen die natürliche N-Acetyl-Gruppe der Glycan-Reste, insbesondere der terminalen N-Acetylneuraminsäure-Reste, durch einen N-



(C₃-C₇)-Acylrest, ausgewählt aus der Gruppe N-Propanoyl, N-Isopropanoyl, N-Pivaloyl bzw. N-Pivanoyl (N-tert-Butylcarbonyl), N-Cyclopropanoyl, N-Butanoyl, N-Pentanoyl, N-Hexanoyl, N-Heptanoyl, N-Crotonoyl und N-Lävulinoyl und/oder
5 einen N-(C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe Propyl, Isopropyl, Pivalyl bzw. tert-Butyl, Cyclopropyl, Butanoyl, Pentanoyl, Hexanoyl, Heptanoyl, Crotonoyl und Lävulinoyl, einschließlich der ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten Analoga davon ersetzt ist.

10

13. Verbindungen nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich dabei um rh Thromboprophylaktika, insbesondere rh Antithrombin III, zur Prophylaxe der Thrombenbildung handelt, in denen die natürliche N-Acetyl-Gruppe der Glycan-Reste, insbesondere der terminalen N-Acetylneuramin-
15 säure-Reste, durch einen N-(C₃-C₇)-Acylrest, ausgewählt aus der Gruppe N-Propanoyl, N-Isopropanoyl, N-Pivaloyl bzw. N-Pivanoyl (N-tert-Butylcarbonyl), N-Cyclopropanoyl, N-Butanoyl, N-Pentanoyl, N-Hexanoyl, N-Heptanoyl, N-
20 Crotonoyl und N-Lävulinoyl, und/oder einen N-(C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe Propyl, Isopropyl, Pivalyl bzw. tert-Butyl, Cyclopropyl, Butanoyl, Pentanoyl, Hexanoyl, Heptanoyl, Crotonoyl und Lävulinoyl, einschließlich der ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder
25 ketylierten Analoga davon ersetzt ist.

14. Verbindungen nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich dabei um rh Gerinnungsfaktoren, insbesondere den rh Faktor VIII und/oder den rh Faktor IX, für die Behandlung von Störungen des Gerinnungssystems, die durch einen erblichen oder erworbenen Mangel an Faktor VIII und/oder Faktor IX bedingt sind, handelt, in denen die natürliche N-Acetyl-Gruppe der Glycan-Reste, insbesondere der terminalen N-Acetylneuraminsäure-Reste, durch einen N-
35 (C₃-C₇)-Acylrest, ausgewählt aus der Gruppe N-Propanoyl, N-Isopropanoyl, N-Pivaloyl bzw. N-Pivanoyl (N-tert-Butylcarbonyl), N-Cyclopropanoyl, N-Butanoyl, N-Pentanoyl, N-Hexanoyl, N-Heptanoyl, N-Crotonoyl und N-Lävulinoyl,

und/oder einen N-(C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe Propyl, Isopropyl, Pivalyl bzw. tert-Butyl, Cyclopropyl, Butanyl, Pentanyl, Hexanyl, Heptanyl, Crotonyl und Lävulinyl, einschließlich der ein- oder mehrfach
5 hydroxylierten und/oder ketylierten Analoga davon ersetzt ist.

15. Verbindungen nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich dabei um rh Interferone, insbesondere rh α-
10 Interferon-Verbindungen, für die Behandlung von bösartigen Tumoren, insbesondere Melanomen, und von Autoaggressionskrankheiten handelt, in denen die natürliche N-Acetyl-Gruppe der Glycan-Reste, insbesondere der terminalen N-Acetylneuraminsäure-Reste, durch einen N-(C₃-C₇)-Acylrest,
15 ausgewählt aus der Gruppe N-Propanoyl, N-Isopropanoyl, N-Pivaloyl bzw. N-Pivanoyl (N-tert-Butylcarbonyl), N-Cyclopropanoyl, N-Butanoyl, N-Pentanoyl, N-Hexanoyl, N-Heptanoyl, N-Crotonoyl und N-Lävulinoyl, und/oder einen N-(C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe Propyl,
20 Isopropyl, Pivalyl bzw. tert-Butyl, Cyclopropyl, Butanyl, Pentanyl, Hexanyl, Heptanyl, Crotonyl und Lävulinyl, einschließlich der ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten Analoga davon ersetzt ist.

25 16. Verbindungen nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich dabei um rh Interferone, insbesondere rh β-Interferon-Verbindungen, für die Behandlung aller Formen der multiplen Sklerose und Viruserkrankungen, vor allem der Virushepatitis B, der Virushepatitis C, der Virushepatitis D und Viruszephalitiden, handelt, in denen die natürliche N-Acetyl-Gruppe der Glycan-Reste, insbesondere der terminalen N-Acetylneuraminsäure-Reste, durch einen N-(C₃-C₇)-Acylrest, ausgewählt aus der Gruppe N-Propanoyl, N-Isopropanoyl, N-Pivaloyl bzw. N-Pivanoyl (N-tert-
35 Butylcarbonyl), N-Cyclopropanoyl, N-Butanoyl, N-Pentanoyl, N-Hexanoyl, N-Heptanoyl, N-Crotonoyl und N-Lävulinoyl und/oder einen N-(C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe Propyl, Isopropyl, Pivalyl bzw. tert-Butyl, Cy-



clopropyl, Butanyl, Pentanyl, Hexanyl, Heptanyl, Crotonyl und Lävulinyl, einschließlich der ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten Analoga davon ersetzt ist.

5

17. Verbindungen nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich dabei um rh Interferone, insbesondere rh γ -Interferon-Verbindungen, für die Behandlung von bösartigen Tumoren, der Virushepatitis B, der Virusheptatitis C, der
10 Virusheptatitis D und von Virusenzephalitiden, handelt, in denen die natürliche N-Acetyl-Gruppe der Glycan-Reste, insbesondere der terminalen N-Acetylneuraminsäure-Reste, durch einen N-(C₃-C₇)-Acylrest, ausgewählt aus der Gruppe N-Propanoyl, N-Isopropanoyl, N-Pivaloyl bzw. N-Pivanoyl
15 (N-tert-Butylcarbonyl), N-Cyclopropanoyl, N-Butanoyl, N-Pentanoyl, N-Hexanoyl, N-Heptanoyl, N-Crotonoyl und N-Lävulinoyl, und/oder einen N-(C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe Propyl, Isopropyl, Pivalyl bzw. tert-Butyl, Cyclopropyl, Butanyl, Pentanyl, Hexanyl, Hep-
20 tanyl, Crotonyl und Lävulinyl, einschließlich der ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten Analoga davon ersetzt ist.

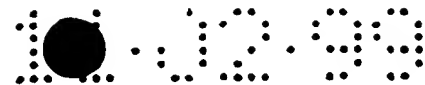
18. Verbindungen nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet,
25 daß es sich dabei um rh Interleukine, insbesondere rh IL-2, rh IL-15, rh IL-16 und rh IL-17, für die Behandlung von bösartigen metastasierenden Tumoren, insbesondere Melanomen, handelt, in denen die natürliche N-Acetyl-Gruppe der Glycan-Reste, insbesondere der terminalen N-
30 Acetylneuraminsäure-Reste, durch einen N-(C₃-C₇)-Acylrest, ausgewählt aus der Gruppe N-Propanoyl, N-Isopropanoyl, N-Pivaloyl bzw. N-Pivanoyl (N-tert-Butylcarbonyl), N-Cyclopropanoyl, N-Butanoyl, N-Pentanoyl, N-Hexanoyl, N-Heptanoyl, N-Crotonoyl und N-Lävulinoyl, und/oder einen N-
35 (C₃-C₇)-Hydrocarbylrest, ausgewählt aus der Gruppe Propyl, Isopropyl, Pivalyl bzw. tert-Butyl, Cyclopropyl, Butanyl, Pentanyl, Hexanyl, Heptanyl, Crotonyl und Lävulinyl, ein-

schließlich der ein- oder mehrfach hydroxylierten und/oder ketylierten Analoga davon ersetzt ist.

19. Verbindungen nach den Ansprüchen 8 bis 18, in denen
5 die natürliche N-Acetylgruppe des N-Acetyl-D-glucosamins durch N-Propanoyl oder N-Cyclopropanoyl oder N-Isoprop-
anoyl oder N-Pivaloyl bzw. N-Pivanoyl (N-tert-Butylcarbo-
nyl) oder N-Butanoyl oder N-Pentanoyl oder N-Hexanoyl ganz
oder teilweise ersetzt worden ist durch biochemische Modu-
10 lation (Biochemical-Engineering) durch Zugabe des jeweils
entsprechenden N-Acyl-D-glucosamin- oder N-Acyl-D-galacto-
samin- oder N-Acyl-neuraminsäure-, insbesondere N-Acyl-D-
mannosamin-Derivats zu dem Kulturmedium in einer Endkon-
zentration im Medium von 0,001 bis 50,0 mM, insbesondere
15 0,5 bis 20 mM, speziell 0,5 bis 5 mM, wobei in dem genann-
ten Kulturmedium die D-Glucose ganz oder teilweise durch
D-Galactose ersetzt sein kann.

20. Verbindungen nach den Ansprüchen 8 bis 19, dadurch
20 gekennzeichnet, daß die natürliche D-Galactose durch 2-
Desoxy-D-galactose ganz oder teilweise ersetzt worden ist
durch biochemische Modulation (Biochemical-Engineering)
durch Zugabe von 2 Desoxy-D-galactose zu dem Kulturmedium
in einer Endkonzentration im Medium von 0,001 bis 50 mM,
25 insbesondere 0,5 bis 20 mM, speziell 0,5 bis 5 mM.

21. Rekombinante Glycoproteine nach mindestens einem der
Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß sie er-
hältlich sind aus einem ein oder mehrere rekombinante Gly-
30 coproteine, insbesondere rekombinante Human-Glycoproteine,
enthaltenden Material, das aus Zellkulturüberständen ge-
wonnen wurde, durch Kultivieren von eukaryoten, vorzugs-
weise tierischen Zellen, besonders bevorzugt nicht-
transformierten oder transformierten CHO-Zellen oder COS7-
35 Zellen oder Nalm-Zellen oder Fibroblasten, in einem übli-
chen Kulturmedium, das als Glycanvorläufer ein N-(C₃-C₇)-
acyliertes und/oder N-(C₃-₇)-hydrocarbyliertes Monosaccha-
rid für die Biosynthese der Aminosucker in einer Konzen-



tration von 0,001 bis 50 mMol/l, vorzugsweise von 0,5 bis 20 mMol/l, enthält, bei einer Temperatur von 18 bis 40°C, vorzugsweise von 30°C, und bei einem pH-Wert von 6,0 bis 8,2, vorzugsweise von 7,2, in an sich bekannter Weise und
5 Abtrennen und Gewinnen des dabei erhaltenen N-Acylderivats bzw. N-Hydrocarbylderivats des Glycoproteins in an sich bekannter Weise und gegebenenfalls ein- oder mehrfaches oder vollständiges Acylieren, vorzugsweise Acetylieren, an den OH- bzw. OR-Gruppen des Monosaccharids, vorzugsweise
10 mittels eines geeigneten Säureanhydrids, insbesondere mit- tels Essigsäureanhydrid, auf an sich bekannte Weise.

22. Verbindungen nach Anspruch 21, dadurch gekennzeich- net, daß zu ihrer Herstellung als Kulturmedium ein FCS-,
15 RPMI 1640-, HAT-, Eagle-MEM-, Dulbecco-MEM- und/oder Glas- gow-MEM-Medium verwendet worden ist.

23. Verbindungen nach Anspruch 21 oder 22, dadurch ge- kennzeichnet, daß zu ihrer Herstellung als Glycanvorläufer
20 N-(C₃-C₇)-Acyl- und/oder N-(C₃-C₇)-Hydrocarbyl-, insbeson- dere N-Propanoyl-, N-Isopropanoyl, N-Pivaloyl- bzw. N- Pivanoyl (N-tert-Butylcarbonyl), N-Cyclopropanoyl-, N- Butanoyl-, N-Pentanoyl-, N-Hexanoyl-, N-Heptanoyl-, N- Crotonoyl-, N-Lävulinoyl-, und/oder N-Propyl-, N-Iso-
25 propyl-, N-Pivalyl- bzw. N-tert-Butyl-, N-Cyclopropyl-, N- Butanyl-, N-Pentanyl-, N-Hexanyl-, N-Heptanyl-, N- Crotonyl- und N-Lävulinyl-D-glucosamin, -D-galactosamin oder -neuraminsäure, insbesondere -D-mannosamin, oder eine Mischung davon verwendet worden ist.

30

24. Pharmazeutisches Mittel, das als Wirkstoff mindestens eine Verbindung nach den Ansprüchen 1 bis 20, gegebenen- falls in Kombination mit anderen Wirkstoffen sowie übli- chen pharmazeutischen Trägern und/oder Hilfsstoffen, ent-
35 hält.

25. Pharmazeutisches Mittel nach Anspruch 24, dadurch ge- kennzeichnet, daß es als Wirkstoff ein oder mehrere rekom-

binante Glycoproteine, insbesondere rekombinante Human-Glycoproteine, oder ein Gemisch unterschiedlich modifizierter N-(C₃-C₇)-Acyl- und/oder N-(C₃-C₇)-Hydrocarbyl-Derivate davon enthält.

5

26. Pharmazeutisches Mittel nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß es den vorzugsweise am Monosaccharid ein- oder mehrfach acylierten, vorzugsweise acetylierten, Wirkstoff (Wirkstoffe) in einer Menge von 0,001 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise von 0,1 bis 20 Gew.-%, insbesondere von 2 bis 10 Gew.-%, enthält.

27. Pharmazeutisches Mittel nach den Ansprüchen 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirkstoff die Verbindungen nach den Ansprüchen 9 bis 10 enthält.

28. Pharmazeutisches Mittel nach den Ansprüchen 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirkstoff die Verbindungen nach Anspruch 11 enthält.

20

29. Pharmazeutisches Mittel nach den Ansprüchen 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirkstoff die Verbindungen nach Anspruch 12 enthält.

30. Pharmazeutisches Mittel nach den Ansprüchen 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirkstoff die Verbindungen nach Anspruch 13 enthält.

31. Pharmazeutisches Mittel nach den Ansprüchen 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirkstoff die Verbindungen nach Anspruch 14 enthält.

32. Pharmazeutisches Mittel nach den Ansprüchen 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirkstoff die Verbindungen nach Anspruch 15 enthält.



33. Pharmazeutisches Mittel nach den Ansprüchen 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirkstoff die Verbindungen nach Anspruch 16 enthält.
- 5 34. Pharmazeutisches Mittel nach den Ansprüchen 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirkstoff die Verbindungen nach Anspruch 17 enthält.
- 10 35. Pharmazeutisches Mittel nach den Ansprüchen 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirkstoff die Verbindungen nach Anspruch 18 enthält.
- 15 36. Verbindungen nach den Ansprüchen 9 und 10 für die Behandlung von Anämien, insbesondere renal bedingten Anämien, in einer Dosierung von 0,001 bis 200 mg/kg Körpergewicht.
- 20 37. Verbindungen nach Anspruch 11 für die Behandlung von Erkrankungen des Blutzellen-bildenden Systems, insbesondere der Agranulozytose oder Thrombopenie, vor allem zur Stimulierung des Wachstums von weißen Blutzellen, insbesondere Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten, in einer Dosierung von 0,001 bis 1,0 mg/kg Körpergewicht.
- 25 38. Verbindungen nach Anspruch 12 für die Behandlung von Thromben oder zur Prophylaxe der Thrombenbildung in einer Dosierung von 1 bis 200 mg/kg Körpergewicht, vorzugsweise von 50 bis 100 mg/kg Körpergewicht.
- 30 39. Verbindungen nach Anspruch 13 zur Prophylaxe der Thrombenbildung in einer Dosierung von 1 bis 200 mg/kg Körpergewicht, vorzugsweise von 50 bis 100 mg/kg, Körpergewicht.
- 35 40. Verbindungen nach Anspruch 14 für die Behandlung von Störungen des Gerinnungssystems, die durch einen erblichen oder erworbenen Mangel an Faktor VIII und/oder Faktor IX

bedingt sind, in einer Dosierung von 0,001 bis 200, vorzugsweise von 0,1 bis 50 mg/kg Körpergewicht.

41. Verbindungen nach Anspruch 15 für die Behandlung von
5 bösartigen Tumoren, insbesondere Melanomen, und von Autoaggressions-Krankheiten in einer Dosierung von 0,001 bis 10 µg/kg Körpergewicht, insbesondere von 0,01 bis 0,1 µg/kg Körpergewicht.
- 10 42. Verbindungen nach Anspruch 16 für die Behandlung aller Formen der multiplen Sklerose und von Viruserkrankungen, vor allem der Virushepatitis B, der Virusheptatitis C, der Virusheptatitis D und Viruszephalitiden in einer
15 Dosierung von 0,001 bis 10 µg/kg Körpergewicht, insbesondere von 0,01 bis 0,1 µg/kg Körpergewicht.
43. Verbindungen nach Anspruch 17 für die Behandlung von bösartigen Tumoren, der Virushepatitis B, der Virusheptatitis C, der Virusheptatitis D und von Viruszephalitiden
20 in einer Dosierung von 0,001 bis 0,1 µg/kg Körpergewicht, insbesondere von 0,01 bis 0,1 µg/kg Körpergewicht.
44. Verbindungen nach Anspruch 18 für die Behandlung von bösartigen metastasierenden Tumoren, insbesondere Melanomen,
25 in einer Dosierung von 0,001 bis 200 µg/kg Körpergewicht.
45. Verbindungen nach den Ansprüchen 1 bis 20 in ihrer an den OH- bzw. OR-Gruppen des Monosaccharid-Restes ein- oder
30 mehrfach acylierten, vorzugsweise acetylierten, Form zu den in den Ansprüchen 36 bis 44 angegebenen Zwecken in einer Dosierung, die vorzugsweise etwa der Hälfte der in den Ansprüchen 36 bis 44 genannten Dosierungen entspricht.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)